

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：81404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591601

研究課題名（和文） 動脈硬化進展に関与するギャップ結合の病態メカニズムについての臨床病理学的解析

研究課題名（英文） Exploring the pathological mechanism of gap junction regarding the progression of atheromatous plaque.

研究代表者

中瀬 泰然（NAKASE TAIZEN）

秋田県立脳血管研究センター・脳卒中医療システム研究部・部長

研究者番号：60390928

研究成果の概要（和文）：

頸動脈における動脈硬化巣の不安定化は脳梗塞の原因となる。この動脈硬化巣の不安定化には酸化ストレスによるマクロファージの活性化、血管内皮の脆弱化、動脈硬化巣そのものの血栓化などが関与している。そこで、脳梗塞予防の観点から、動脈硬化巣の安定化に影響を与える要因を検討した。本研究では、細胞間連絡器官であるギャップ結合の構成蛋白であるコネキシン(Cx)の発現に着目し、酸化ストレスを受けている細胞との関連を免疫組織学的に観察した。その結果、サブタイプのCx37は酸化ストレスに関連した動脈硬化巣の安定化に、Cx43は酸化ストレスとは独立した動脈硬化巣の安定化に寄与していることが推測された。

研究成果の概要（英文）：

Fragility of atheromatous plaque in the internal cervical artery can be a risk of brain infarction. The activation of macrophage by oxidative stress, the vulnerability of vascular endothelial cell and the thrombogenesis of plaque have been reported to participate in the fragility of atheromatous plaque. Therefore, from the view point of prevention of brain infarction, we investigated the factor which may influence on the stabilization of atheromatous plaque. The expression of connexin (Cx) which composes gap junction, an intercellular communication organ, was immunohistochemically observed in the atheromatous plaques of human operation sample. As the results, Cx37 and Cx43 subtypes were related to the stabilization of the plaque affected by oxidative stress and the plaque independent from oxidative stress, respectively. It is suggested that each subtype of Cx may have different effect on the pathogenesis of atheromatous plaque.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学、神経病理学、脳梗塞、動脈硬化

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は脳梗塞発症の主要な原因の一つである。そのため動脈硬化の進展予防は脳梗塞予防治療の重要な要素といえる。動脈硬化の原因については、臨床的には高血圧や糖尿病、脂質異常、メタボリックシンドロームなどがあげられ、これらの疾患では血管内皮への慢性的な物理的ストレスが引き金とされている。ストレスを受けた内皮細胞は ICAM-1 や VCAM-1 などの細胞接着分子を発現し、単球や白血球の接着・遊走を促し、マクロファージの増殖へとつながる。同時に LDL や VLDL などの脂質も内皮から取り込まれ、マクロファージが貪食することで泡沫細胞化し、アテローム硬化巣が形成される。このアテローム硬化性プラークには安定性のものと不安定性のものがあり、不安定性のものはマクロファージや脂質沈着が進行し、あるいはプラーク内で出血が生じるため、血管内皮の破綻につながる。また、アテローム硬化性プラークの不安定化に炎症性サイトカインや酸化ストレスの関与も報告されている。酸化ストレスにより生じた酸化型 LDL (OxLDL) は強い細胞毒性を示し、それを取り込んだ泡沫細胞のみならず内皮細胞や平滑筋細胞にも働きかけ動脈硬化促進に作用すると考察されている。しかし、プラークの不安定化には血管内皮基底膜にあるコラーゲン線維の減少や脆弱化が必要で、さらに内皮細胞の破綻がなくても血栓化が生じることも報告されており、不安定性プラークが進展・悪化していくメカニズムについては、いまだ結論が出ていない。一方、マクロファージの増殖や血管内皮細胞の脆弱化に対して、細胞間連絡器官であるギャップ結合の関与が注目されている。ギャップ結合を構成するタンパク質はコネクシン (Cx) と呼ばれ、細胞の種類により分子量の異なったコネクシンサブタイプが存在している。血管系では Cx37、Cx40、Cx43、Cx45 などのサブタイプが報告されている。平滑筋細胞の Cx43 ノックアウトマウスでは平滑筋細胞増殖が促進されることから血管リモデリングにはギャップ結合が効果的に働くという報告がある一方で、脂質異常治療薬であるスタチン製剤の投与で内皮細胞の Cx37 と Cx40 の発現が抑制され、また Cx43 欠損マウスではアテローム硬化病変が減少するという報告もある。同じアテローム硬化性プラーク内でも細胞の種類によりギャップ結合の関与が異なることが推測され、実際のヒトにおける動脈硬化病

変での病理変化を検討する必要性が出てきている。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞に直接関与する頸動脈のアテローム硬化性プラークについて、手術時に得られたヒト組織標本を用いて病理学的に評価する。そして、各コネクシン蛋白の発現量、発現細胞などを観察し、術前内服薬との関連やプラーク正常との関連を検討し、頸動脈アテローム硬化性プラークにおけるギャップ結合の関与を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

内頸動脈内膜剥離術により摘出・保存されたサンプルを対象とした。動脈硬化巣で発現しているコネクシンサブタイプのうち Cx30、Cx37、Cx40、Cx43、Cx45 の発現と、血管内皮細胞や平滑筋細胞、マクロファージとの関連を免疫組織染色で観察し、各種細胞におけるコネクシンサブタイプ発現量の差異、動脈硬化巣における分布の違いなどを検討した。不安定プラークの特徴を明らかにするため、酸化型 LDL レセプターの標識用に抗 CD36 抗体を用い、抗 CD68 抗体を用いたマクロファージとの二重染色も行った。また、術前に内服していた高血圧治療薬、脂質異常治療薬、糖尿病治療薬、抗血小板薬については診療記録より確認した。そして、コネクシン蛋白の発現量やそのサブタイプを内服薬との関連や臨床症状との関連において比較検討した。

### 4. 研究成果

まず、新鮮凍結切片を用いて各社の抗 CD36 抗体についてその性能を評価した。次に、適正と考えられた抗体を用いて、より安定した結果を得られるパラフィン包埋切片に対して免疫組織染色を行った。結果は光学顕微鏡にて確認した。

表 1	CD36 発現	
	マクロファージ	繊維芽細胞
高血圧	—	—
糖尿病	—	↑
脂質異常症	—	—
喫煙	↑	—
アスピリン	—	↓
クロビドグレル	↓	—
ARB	↓	—
スタチン	↓	—

その結果、対象となったのは11症例11サンプル。CD36発現は糖尿病や喫煙で増加し、抗血小板薬、スタチン製剤、アンギオテンシンII受容体阻害薬(ARB)の内服で減少していることが判明した(表1)。

さらに、Cx37はCD36と共発現を認めましたがCx43は共発現を認めなかった。そして、Cx蛋白発現症例では症候性プラークの割合が有意に低値であった(表2)。

n	Cx発現	
	無	有
症候性病変 無	1	4
有	5	1

以上より、Cx37は酸化ストレスに関連したアテローム硬化性プラークの安定化に、Cx43は酸化ストレスとは独立したプラークの安定化に寄与していることが推測された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

① Taizen Nakase, Shotaroh Yoshioka, Masahiro Sasaki, Akifumi Suzuki. Clinical evaluation of lacunar infarction and branch atheromatous disease. J Stroke Cerebrovasc Dis. 22. 2013. 406-412. 査読有、DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.10.005

② Taizen Nakase, Shotaroh Yoshioka, Masahiro Sasaki, Akifumi Suzuki. Clinical features of recurrent stroke after intracerebral hemorrhage. Neurol Int 4. 2012. E10. 査読有、DOI: 10.4081/ni.2012.e10

③ 中瀬泰然、亀田知明、鈴木明文、長田乾. 脳出血後の血圧日内変動パターンの変化についての24時間血圧計を用いた検討. 脳卒中 34. 2012. 215-220. 査読有

④ Taizen Nakase, Shotaroh Yoshioka, Akifumi Suzuki. Free radical scavenger, edaravone, reduces the lesion size of lacunar infarction in human brain ischemic stroke. BMC Neurol 11. 2011. 39. 査読有、DOI: 10.1186/1471-2377-11-39

[学会発表] (計 5件)

① Nakase T, Sasaki M, Yoshioka S, Ikeda Y, Suzuki A. Anti-platelet medication for the progressing stroke with small vessel occlusion. 58<sup>th</sup> Annual meeting of the scientific and standardization committee

of the ISTH. Liverpool, UK. 2012. 6. 27

② 中瀬泰然、吉岡正太郎、池田靖子、佐々木正弘、鈴木明文. 超急性期血栓溶解療法における炎症反応の変化について、通常治療との比較検討. 53回日本神経学会総会、東京、2012. 5. 22

③ 中瀬泰然、吉岡正太郎、佐々木正弘、鈴木明文. 脳梗塞急性期における安全な血圧レベルは?—SPECTによる脳血流の評価から—. 52回日本神経学会総会、名古屋、2011. 5. 18

④ 中瀬泰然、玉川紀之、金子妙子、宮田元. アテローム硬化性病変における酸化型LDLレセプターCD36の発現に関する免疫組織化学的検討. 52回神経病理学会、京都、2011. 6. 2

⑤ 中瀬泰然、吉岡正太郎、佐々木正弘、鈴木明文. ラクナ梗塞とBranch Atheromatous Diseaseに対する急性期治療の検討. 36回脳卒中学会総会、京都、2011. 7. 31

[図書] (計 1件)

① 中瀬泰然. 急性期脳梗塞. 総編集 山口徹ら. 今日の治療指針2013. 医学書院. 2013. pp781-783.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中瀬 泰然 (NAKASE TAIZEN)

秋田県立脳血管研究センター・脳卒中医療システム研究部・部長  
研究者番号: 60390928

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: